

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-209357

(43) 公開日 平成11年(1999) 8月3日

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号

C 0 7 D 279/20
A 6 1 B 10/00
C 0 9 B 67/22
G 0 1 N 30/88

F I

C 0 7 D 279/20
A 6 1 B 10/00 T
C 0 9 B 67/22 Z
G 0 1 N 30/88 C

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願平10-295607
(22) 出願日 平成10年(1998)10月16日
(31) 優先権主張番号 P C T / U S / 9 7 / 2 0 9 8 1
(32) 優先日 1997年11月13日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 0 9 / 1 1 0 - 7 8 8
(32) 優先日 1998年7月6日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 598142999
ズィラ、インコーポレイテッド
Z i l a , I n c .
アメリカ合衆国 85014-2800 アリゾナ、
フェニックス、ノース セブンス ストリ
ート 5227
(72) 発明者 ダグラス デー パーケット
アメリカ合衆国 85004 アリゾナ、フェ
ニックス、イースト リバティアー レーン
4113
(74) 代理人 弁理士 萩野 平 (外3名)

(54) 【発明の名称】 形成異常の組織を確認するための生体内における染色組成物、その製造方法および使用方法

(57) 【要約】

【課題】 トルイジンブルーOの比率が高く、安定した品質の染色用組成物とその製造方法を提供し、さらに、該染色用組成物を用いて、形成異常の組織を確認する方法と該染色組成物を分析する方法を提供する。

【解決手段】 N、N-ジメチル-p-フェニレンジアミンを酸化して、2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸を生成し、さらに酸化、かつo-トルイジンと縮合させてインダミンチオスルホン酸を生成し、さらに酸化することによりそのインダミン環を閉環して、トルイジン・ブルーO(TBO)含有の反応生成物を生成する工程において、該TBO含有の反応生成物の形成前に上記錯体化試薬を導入することを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (A)トルイジン・ブルーOの異性体、および(B)上記異性体のN-脱メチル化誘導体において、上記異性体(A)を示す254nmにおけるHPLCのピークの合わせた面積と、上記N-脱メチル化誘導体(B)を示すピークの合わせた面積との比が、少なくとも約6:1であることを特徴とする異性体(A)および誘導体(B)を含む物質の新規な組成物。

【請求項2】 (A)環の2-位にメチル基を有するトルイジン・ブルーOの異性体、そのN-脱メチル化誘導体およびそのN, N-脱メチル化誘導体からなる第一の群の成分、ならびに(B)環の4-位にメチル基を有するトルイジン・ブルーOの異性体、そのN-脱メチル化誘導体およびそのN, N-脱メチル化誘導体からなる第二の群の成分において、上記第一の群(A)を示す254nmにおけるHPLCのピークの合わせた面積と、上記第二の群(B)を示すHPLCのピークの合わせた面積との比が、少なくとも約2.5:1であることを特徴とする第一の群の成分(A)および第二の群の成分(B)を含む物質の新規な組成物。

【請求項3】 環の2-位にメチル基を有する異性体(ピーク8)が前記組成物中の全有機染料含量の少なくとも58%を構成する、トルイジン・ブルーOの異性体を含む請求項1, 2記載の組成物。

【請求項4】 液状担体中の請求項1または2記載の組成物をヒトの口の組織に適用する段階を含む形成異常の組織を確認する方法。

【請求項5】 (A)第一の反応混合物中のN, N-ジメチル-p-フェニレンジアミンを酸化して、第一中間体である2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸を生成し、(B)上記第一中間体を酸化し、かつ第二の反応混合物中の酸化物をo-トルイジンと縮合させて、第二中間体であるインダミンチオスルホン酸を生成し、(C)上記第二中間体を酸化することによりそのインダミン環を閉環して、第三の反応混合物中に溶解したトルイジン・ブルーO(TBO)含有の反応生成物を生成し、(D)上記第三の反応混合物中に錯体化試薬を導入して、上記第三の反応混合物中に溶解したTBO-錯体生成物を生成し、(E)上記第三の反応混合物から上記TBO-錯体生成物を沈殿させ、そして(F)上記第三の反応混合物から、TBOの異性体、そのN-脱メチル化およびN, N-脱メチル化誘導体含有の上記TBO-錯体生成物を分離する工程を包含し、上記第三の反応混合物の形成前の反応混合物に上記錯体化試薬を導入することを特徴とするトルイジン・ブルーOの改良された製造方法。

【請求項6】 反応混合物の温度を約10℃以下に保持する請求項5記載の方法。

【請求項7】 反応混合物のpHを、第一の反応混合物では約2.8~3.8の範囲に、第二の反応混合物では約

3.1~4.1の範囲に、第三の反応混合物では約3.0に維持する請求項5記載の方法。

【請求項8】 トルイジン・ブルーOの異性体のうちの1つであるN-脱メチル化誘導体。

【請求項9】 トルイジン・ブルーOの異性体のうちの1つであるN, N-脱メチル化誘導体。

【請求項10】 移動相を形成し、TBO試料溶液を形成し、HPLCカラムを移動相の流れと平衡させ、そしてHPLCカラムに試料溶液を注入することを包含し、試料の染料成分を同定しかつ上記試料の純度を分析・測定するために、上記移動相を水可溶性の有機酸塩含有の組成物として形成することを特徴とするHPLCによるトルイジン・ブルーO染料生成物の改良された分析方法。

【請求項11】 前記第一の反応混合物の温度を約10℃以下の温度に保持しながら、チオサルフェートイオン源を上記第一の反応混合物に導入する工程を含む請求項5記載の方法。

【請求項12】 反応混合物の温度を約10℃以下に保持しながら、N, N-ジメチル-p-フェニレンジアミンをチオサルフェートイオン源の存在下に酸化する工程を含む2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸の合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトの生体内の局所的な適用に適合する新規な生物学的染色組成物に関する。特に、本発明は、トルイジン・ブルーO(“TBO”)と特定のTBO誘導体を特定の割合で含有する新規なTBO染料生成物を意図するものである。また、別の態様によれば、本発明は、上記新規なTBO生成物を含むTBO組成物の新規な製造法に関する。さらに、本発明は、主要な製造工程の経済性と製造装置の高められた生産能力をもたらすTBO生成物の収率がより高い改良された製造方法に関する。

【0002】なお別の態様において、本発明は、形成異常すなわち異常であるとの疑いがある組織を確認する上記新規なTBO組成物を生体内で使用方法に関する。さらになお別の態様において、本発明は、形成異常の疑いがある口の組織、特に癌症状および前癌症状の組織の検知に特に適合する組成物、その使用による生体内での診断方法およびその製造方法に関する。なお別の観点において、本発明は、合成され、分離同定され、回収されたTBOの新規なN-脱メチル化生成物に関する。別の態様において、本発明は、異性体および他の構造関連化合物を含有するTBO生成物のHPLC分析方法に関する。本発明の様々な実施の形態およびその実施は、特許請求の範囲および添付した図面と関連する後記の発明の実施の形態から、当業者ならば明らかになるであろう。

【従来の技術】

【0003】大部分の口の病巣は外傷から生じる。しかし、口の他の病巣については、その幾らかは形成異常の腫瘍で始まるが、幾らかは癌症状または前癌症状のいずれかであろう。さらに、多くの形成異常の病巣は、小さくて臨床歯医者によるありふれた視覚検査では簡単に見逃される。形成異常の疑いがある口の組織を確認し輪郭を描く生体内での診断試験は公知である。このスクリーニング試験は、一般にマッシュバーグ (Mashberg) に対して付与された米国特許第4,321,251号明細書およびツッシー (Tucci) 等に対して付与された米国特許第5,372,801号明細書に記載されている。比較的最近、他のありふれた歯の処置の一部として臨床医が素早く簡単に試験を行い、このようにして患者に症状の自覚がない時、あるいは形成異常の病巣が小さくて通常の視覚検査中には見逃される時、疑わしい箇所を確認しおよび/または輪郭を描くことを可能にするキットが開発された。形成異常の疑いのある病巣がマッシュバーグのプロトコルにより確認されると、正常な生体組織片の検査試料を取り出して、病巣が悪性であるかまたは前癌症状のものであるかどうかを決定するために、検査試料を組織学的な検査に付すことができる。この試験を実施するための適正な量と濃度の予め混合された染料および洗浄溶液を含有するキッ*

＊トは、ジラ (Zila) 社に認可され、オラスカン (ORASCA N[®]) の商標名でジャーミフェン (Germiphene) 社からカナダで、またオラスクリーン (登録商標 "ORASCREE N[®]") の商標名でスタフォード・ミラー (Stafford-Miller) 社からイギリスとオーストラリアで市販されている。

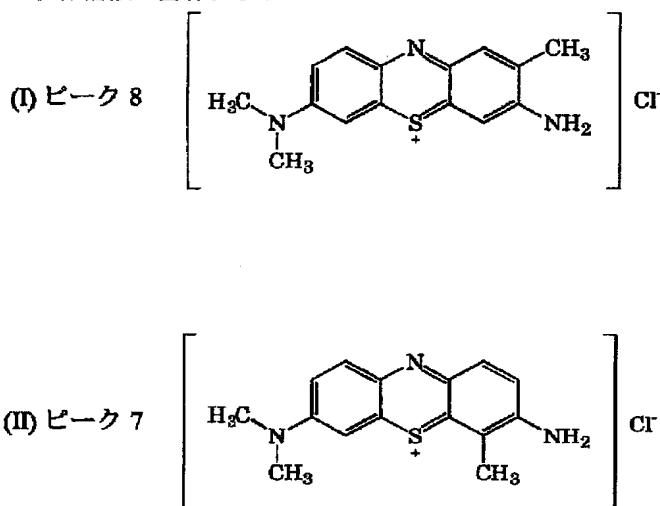
【0004】従来技術のTBO生成物

市販されていた典型的な従来技術のTBO製品における有機染料の含量は、販売人にも依存するが、比較的低いことが今になって発見された。典型的には、これら従来技術の製品におけるTBOの異性体を示す254nmにおけるHPLCのピーク (実施例3のHPLCの手法、参照) の合わせた面積は、全てのTBOおよびTBO関連成分、すなわちTBOの2種の異性体と6種までのTBO関連成分との和を示す254nmにおけるHPLCのピークの合わせた面積の僅か約2%~75%にすぎなかった。

【0005】図1において、HPLCのピーク7および8は、TBO (同図では塩化物塩を示している) の2種の異性体を示す。

【0006】

【化1】

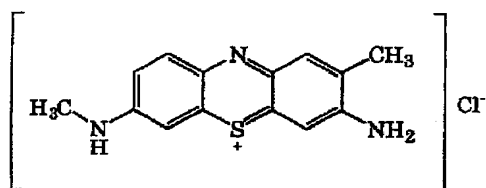


【0007】HPLCのピーク5および6は、TBOの2種の異性体におけるN-脱メチル化誘導体と同定された。

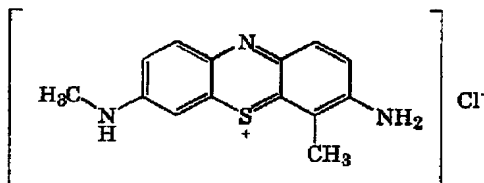
【0008】

【化2】

(III) ピーク 6



(IV) ピーク 5



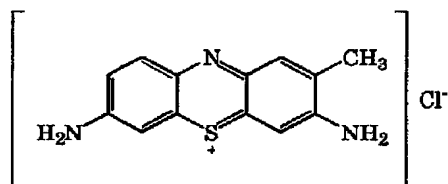
【0009】HPLCのピーク2および3は、TBOの2種の異性体におけるN、N-脱メチル化誘導体と同定された。

*【0010】

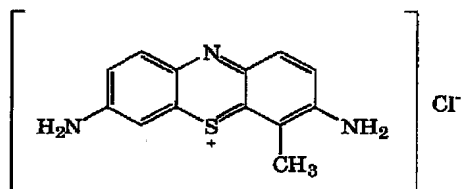
【化3】

*20

(V) ピーク 3



(VI) ピーク 2



【0011】なお、HPLCのピーク1および4により示された化合物の正確な構造は、積極的には同定しなかった。

【0012】従来技術のTBO組成物すなわち図1に示される典型的なものにおいては、あらゆる割合で、ピーク1～4により示される化合物が本発明のもの（図2参照）より比較的高い量で存在し、ピーク5～8により示される化合物は本発明のTBO生成物より比較的低い量で存在した。ピーク5および6により示される従来技術（図1）のTBOの異性体における2種のN-脱メチル化誘導体は、本発明者の発明のTBO生成物に存在するものより比較的高い量で存在し、典型的には有機染料の含量が20%より多く存在した。

【0013】従来技術におけるTBOの製造方法

TBOの古典的な合成は、1989年11月30日に発行されダンドライカー（Dandliker）等に対して付与された米国特許第418,055号明細書に実例が挙げられている。この合成は次の一連の3つの酸化工程からなる。

(1) N、N-ジメチル-p-フェニレンジアミンを例えば重クロム酸カリウムで酸化して、2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸を生成する；

(2) このチオスルホン酸をo-トルイジンと縮合して、対応するインダミンチオスルホン酸を生成する；そして(3) このインダミンチオスルホン酸を例えば塩化亜鉛の存在下に沸点温度で約30分間閉環反応に付し

て、TBOを生成する。次に、反応混合物を冷却し、閉

環反応のTBO生成物を錯体化し、例えば塩化ナトリウムおよび塩化亜鉛で処理して塩析し、TBO錯体例えばTBO/ZnCl₂錯体を沈殿させる。再溶解と再沈殿を繰り返すことにより、例えば熱い塩化亜鉛水溶液中での再溶解および塩化ナトリウム/塩化亜鉛での再沈殿により、精製を実施することができる。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】既知の範囲内では、生体内での形成異常の確認にTBOを使用する研究に従事した従来の研究者は、上記した従来技術のTBO生成物、すなわち、TBOの異性体にN-脱メチル化およびN, N-脱メチル化誘導体を加えたものの和が染料組成物の80%未満であり、かつ異性体の2種のN-脱メチル化誘導体が染料組成物の約20%より多く生成した組成物を使用していた。本発明者の見聞によれば、従来の研究者は彼らの“TBO”生成物の正確な組成を知らず、従来技術のTBO生成物の製造法ではそれを反復して調製することができず、再現性がなかった。実際、TBOの品質についての当時有力な文献には単に“良好な色相値のトルイジン・ブルー”と記載されているだけである。生物染色委員会は、物質の“有機染料の含量”のみを測定する滴定分析法を明記している。このような大雑把に定められた“TBO”の従来技術における使用は、結果的に首尾一貫しない臨床観察と、ヒトの診断法に使用される上記生成物の製造および市場での取引に必要な取締許可証を取得する際に重大な問題をもたらした。

【0015】したがって本発明の目的は、上記従来技術の欠点を克服し、トルイジンブルーOの比率が高く、安定した品質の染色組成物を提供することである。また本発明の別の目的は、上記のトルイジンブルーOの比率が高く、安定した品質を有する染色組成物を製造するための方法を提供するものである。また本発明のさらなる別の目的は、上記の染色組成物を用いて、形成異常の組織を確認する方法を提供しようとするものである。本発明の別のもう一つの目的は、上記染色組成物を分析する方法を提供しようとするものである。

【0016】

【課題を解決するための手段】すなわち本発明は以下のとおりである。

(1) (A)トルイジン・ブルーOの異性体、および(B)上記異性体のN-脱メチル化誘導体において、上記異性体(A)を示す254nmにおけるHPLCのピークの合わせた面積と、上記N-脱メチル化誘導体(B)を示すピークの合わせた面積との比が、少なくとも約6:1であることを特徴とする異性体(A)および誘導体(B)を含む物質の新規な組成物。すなわち、(A)トルイジン・ブルーOの異性体、および(B)上記トルイジン・ブルーOの異性体のN-脱メチル化誘導体を含む染色用組成物において、上記異性体(A)を示す254nmにおけるHPL

Cのピークを合わせた面積が、上記N-脱メチル化誘導体(B)を示すピークを合わせた面積の約6倍以上であることを特徴とする染色用組成物。

(2) (A)環の2-位にメチル基を有するトルイジン・ブルーOの異性体、そのN-脱メチル化誘導体およびそのN, N-脱メチル化誘導体からなる第一の群の成分、ならびに(B)環の4-位にメチル基を有するトルイジン・ブルーOの異性体、そのN-脱メチル化誘導体およびそのN, N-脱メチル化誘導体からなる第二の群の成分において、上記第一の群(A)を示す254nmにおけるHPLCのピークの合わせた面積と、上記第二の群(B)を示すHPLCのピークの合わせた面積との比が、少なくとも約2.5:1であることを特徴とする第一の群の成分(A)および第二の群の成分(B)を含む物質の新規な組成物。すなわち、(A)環の2-位にメチル基を有するトルイジン・ブルーOの異性体、そのN-脱メチル化誘導体およびそのN, N-脱メチル化誘導体からなる第一の群の成分、ならびに(B)環の4-位にメチル基を有するトルイジン・ブルーOの異性体、そのN-脱メチル化誘導体およびそのN, N-脱メチル化誘導体からなる第二の群の成分を含む染色用組成物において、上記第一の群(A)を示す254nmにおけるHPLCのピークを合わせた面積が、上記第二の群(B)を示すHPLCのピークを合わせた面積の約2.5倍以上であることを特徴とする染色用組成物。

【0017】(3) 環の2-位にメチル基を有する異性体(ピーク8)が前記組成物中の全有機染料含量の少なくとも58%を構成する、トルイジン・ブルーOの異性体を含む上記(1)または(2)記載の組成物。すなわち、環の2-位にメチル基を有する異性体(ピーク8)が前記組成物中の全有機染料含量の少なくとも58%であることを特徴とする上記(1)または(2)記載の染色用組成物。

(4) 液状担体中の上記(1)または(2)記載の組成物をヒトの口の組織に適用する段階を含む形成異常の組織を確認する方法。すなわち上記(1)または(2)記載の染色用組成物を液状担体中に含有させ、ヒトの口の組織に適用する段階を含む形成異常の組織を確認する方法。

【0018】(5) (A)第一の反応混合物中のN, N-ジメチル-p-フェニレンジアミンを酸化して、第一中間体である2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸を生成し、(B)上記第一中間体を酸化し、かつ第二の反応混合物中の酸化物をo-トルイジンと縮合させて、第二中間体であるインダミンチオスルホン酸を生成し、(C)上記第二中間体を酸化することによりそのインダミン環を閉環して、第三の反応混合物中に溶解したトルイジン・ブルーO(TBO)含有の反応生成物を生成し、(D)上記第三の反応混合物中に錯体化試薬を導入して、上記第三の反応混合物中に溶解したTBO-錯体生成物を生成し、(E)上記第三の反応混合物から上記

TBO-錯体生成物を沈殿させ、そして(F)上記第三の反応混合物から、TBOの異性体、そのN-脱メチル化およびN、N-脱メチル化誘導体含有の上記TBO-錯体生成物を分離する工程を包含し、上記第三の反応混合物の形成前の反応混合物に上記錯体化試薬を導入することを特徴とするトルイジン・ブルーOの改良された製造方法。すなわち、(A)第一の反応混合物中のN、N-ジメチル-p-フェニレンジアミンを酸化して、第一中間体である2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸を生成し、(B)上記第一中間体を酸化し、かつ第二の反応混合物中の酸化物をo-トルイジンと縮合させて、第二中間体であるインダミンチオスルホン酸を生成し、(C)上記第二中間体を酸化することによりそのインダミン環を閉環して、第三の反応混合物中に溶解したトルイジン・ブルーO(TBO)含有の反応生成物を生成し、(D)上記第三の反応混合物中に錯体化試薬を導入して、上記第三の反応混合物中に溶解したTBO-錯体生成物を生成し、(E)上記第三の反応混合物から上記TBO-錯体生成物を沈殿させ、そして(F)上記第三の反応混合物から、TBOの異性体、そのN-脱メチル化およびN、N-脱メチル化誘導体含有の上記TBO-錯体生成物を分離する工程を包含するトルイジン・ブルーOの製造方法において、上記第三の反応混合物の形成前の反応混合物に上記錯体化試薬を導入することを特徴とするトルイジン・ブルーOの製造方法。

【0019】(6) 反応混合物の温度を約10℃以下に保持する上記(5)記載の方法。すなわち、反応温度を約10℃以下に保持する上記(5)記載の方法。

(7) 反応混合物のpHを、第一の反応混合物では約2.8~3.8の範囲に、第二の反応混合物では約3.1~4.1の範囲に、第三の反応混合物では約3.0に維持する上記5記載の方法。すなわち、反応混合物のpHを、第一の反応では約2.8~3.8の範囲に、第二の反応では約3.1~4.1の範囲に、第三の反応では約3.0に維持する上記5記載の方法。

(8) トルイジン・ブルーOの異性体のうちの1つであるN-脱メチル化誘導体。

(9) トルイジン・ブルーOの異性体のうちの1つであるN、N-脱メチル化誘導体。

(10) 移動相を形成し、TBO試料溶液を形成し、HPLCカラムを移動相の流れと平衡させ、そしてHPLCカラムに試料溶液を注入することを包含し、試料の染料成分を同定しかつ上記試料の純度を分析・測定するために、上記移動相を水可溶性の有機酸塩含有の組成物として形成することを特徴とするHPLCによるトルイジン・ブルーO染料生成物の改良された分析方法。すなわち、移動相となる展開溶媒とTBO試料溶液とを調製し、HPLCカラムに該展開溶媒を展開し平衡化した後に、該試料溶液を該HPLCカラムに注入することを包含するトルイジン・ブルーO染料生成物の分析方法にお

いて、該試料の染料成分を同定しかつ上記試料の純度を分析・測定するために、該展開溶媒を水可溶性の有機酸塩含有の組成物として調製することとを特徴とするトルイジン・ブルーO染料生成物の分析方法。

【0020】(11) 上記第一の反応混合物の温度を約10℃以下の温度に保持しながら、チオサルフェートイオン源を上記第一の反応混合物に導入する工程を含む上記(5)記載の方法。すなわち、上記第一の反応温度を約10℃以下の温度に保持しながら、チオサルフェートイオン源を上記第一の反応混合物に導入する工程を含む上記(5)記載の方法。

(12) 反応混合物の温度を約10℃以下に保持しながら、N、N-ジメチル-p-フェニレンジアミンをチオサルフェートイオン源の存在下に酸化する工程を含む2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸の合成方法。すなわち、反応温度を約10℃以下に保持しながら、N、N-ジメチル-p-フェニレンジアミンをチオサルフェートイオン源の存在下に酸化する工程を含む2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸の合成方法。

【0021】本発明の態様を実施する物質の新規な組成物は、短く述べると、TBOの異性体およびこれらの異性体のN-脱メチル化誘導体からなり、TBO異性体を示す254nmにおけるHPLCのピークの合わせた面積（実施例3のHPLCの手法に従って測定される）とそのN-脱メチル化誘導体を示すピークの合わせた面積との比が少なくとも約6：1であるようなTBOの異性体とそのN-脱メチル化誘導体との比で両者が存在するTBO生成物である。このように、図2に表すように、TBO異性体（ピーク7および8）を示す254nmにおけるHPLCのピークの合わせた面積は、その各々のN-脱メチル化誘導体（ピーク5および6）を示す254nmにおけるHPLCのピークの合わせた面積の少なくとも約6倍ある。本発明の好ましい実施の態様においては、ピーク5、6、7および8によって示される成分は、生成物における有機染料の含量の少なくとも約95%に及ぶ。とりわけ好ましい実施の態様においては、ピーク8（254nm）の面積は、生成物における有機染料の含量の少なくとも58%を示す。

【0022】また、本発明は、上記新規なTBO生成物をヒトの組織に適用する段階を包含するヒトの生体内で形成異常の組織を検知する方法を意図するものである。本発明のなお別の実施の態様は、ダンドライカー（Dandliker）の合成における閉環（第三の）工程前に、好ましくはプロセスの第一の酸化工程（図3の符号11）前の反応混合物に錯体化試薬を添加する前記新規なTBO生成物を包含する、TBO組成物を反復して製造できる新規で一般的なプロセスにある。従来技術のダンドライカーのプロセスは次の工程を包含する。N、N-ジメチル-p-フェニレンジアミン・イオンを第一の

反応混合物中で酸化して、第一中間体である2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸を生成する、第一中間体を酸化し、かつ酸化物を第二の反応混合物中でo-トリイジンと縮合させて、第二中間体であるインダミンチオスルホン酸を生成する、第二中間体を第三の反応混合物中で酸化してそのインダミン環を閉環し、第三の反応混合物中に溶解したTBO反応生成物を生成する、錯体化試薬を上記第三の反応混合物中に導入して、TBO-錯体生成物を生成する、そして上記TBO-錯体を上記第三の反応混合物から分離する。従来技術のダンドライカーのプロセスに対する本発明の改良は、第三の反応混合物の形成より早い段階で、好ましくは第二の反応混合物の形成前に錯体化試薬を添加する工程からなる。

【0023】なお更にそして目下のところ好ましい実施の態様、特に本発明の新規なTBO生成物含有の組成物の製造に適した実施の態様によれば、酸化工程中の反応混合物の温度を約10℃以下に維持することである。なお別の更にそして目下のところ好ましい実施の態様、特にTBO生成物の品質の改良に適した実施の態様においては、酸化工程中の反応混合物のpHを、第一の反応混合物では約2.8~3.8（好ましくは3.3）の範囲に、第二の反応混合物では約3.1~4.1（好ましくは3.6）の範囲に、第三の反応混合物では約3.0に維持することである。なお別のそして目下のところ好ましい実施の態様において、先に簡単に述べた本発明の新規で一般的なプロセスが改良され、TBO生成物の収率の大きな増加をもたらす。

【0024】

【発明の実施の形態】図1に表すように、以前から市販されている典型的なTBOには、TBOの異性体を示す2つの254nmHPLCピーク（ピーク7および8）と、上記異性体の脱メチル化誘導体であることが本発明者により発見された2つの254nmHPLCピーク（ピーク5および6）とがある。この従来技術の典型的な生成物におけるTBOの異性体とそのN-脱メチル化誘導体との相対的な量は、異性体とN-脱メチル化誘導体とのピーク面積の比が4:1未満であった。すなわち異性体の面積がN-脱メチル化誘導体の面積の4倍未満であった。6:1に接近するかまたはそれを超える一層高い比は、すなわち異性体の面積がN-脱メチル化誘導体の面積の6倍を超える比は、従来技術において単離されたTBO生成物にはからずとも存在したが、該生成物の相対的な量は知られてなかったかあるいは重要とはみなされてなかった。いかなる場合でも、従来技術の製造方法では上記高い比を有するTBO生成物を反復して調製することはできなかった。

【0025】最近の臨床試験に基づく規制要件によれば、形成異常の組織を検知するヒトの診断法（一般にマッシュバーク（Mashberg）のプロトコルに相応す

る）に使用されるべきTBOは、TBOの異性体とそのN-脱メチル化誘導体との254nm比で、約6:1以上のHPLCピーク面積比でなければならない。すなわち、254nmHPLCピーク7および8を合わせた面積が、254nmHPLCピーク5および6を合わせた面積の少なくとも約6倍より大きくなければならない。異性体の254nmHPLCピークの面積とその脱メチル化誘導体の面積との比が少なくとも6:1であるヒトの診断試験法の要件に合致するTBO生成物含有の組成物を提供することは、非常に望ましいであろう。さらに、TBO異性体とそのTBO脱メチル化誘導体が上記特定の比にある上記TBO生成物を信頼できかつ反復して調製することができ、しかも収率と全体の純度の高い他のTBO生成物を信頼できかつ反復して調製することができる製造方法を提供することは、非常に望ましいであろう。

【0026】本発明の典型的な組成物の254nmHPLC分析を表す図2から明らかであろうが、TBO異性体とN-脱メチル化誘導体のピーク面積比は、少なくとも約6:1より大きい。すなわち、254nmHPLCピーク7および8を合わせた面積がピーク5および6を合わせた面積より約6.68倍大きいという事実から明らかのように、上記比は6.68:1である。HPLCおよび燃焼試験により測定され、かつ[100から燃焼残渣の百分率を減算したもの]を本発明のTBO生成物のHPLC純度（すなわち、ピーク5、6、7および8の面積の合計を全ピーク面積で除算したもの）と乗算したものととして定義される全体の純度は、従来技術の大部分の組成物が2~10%であるのに対して、少なくとも75%より高い。従来技術の生成物を偶然に単離した場合には、匹敵する純度が得られたかも知れないが、反復性して得ることはできなかった。

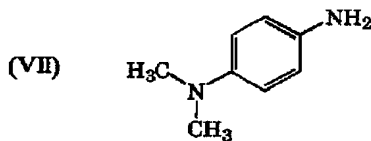
【0027】本発明の一態様によれば、環の2-位にメチル基（例えば、化学式(I)参照）を有するピーク（ピーク3、6および8）の面積と、環の4-位にメチル基（例えば、化学式(II)参照）を有するピーク（ピーク2、5および7）の面積の比は、2.5:1以上である。これに反して、本発明者の知るところによれば、従来技術の生成物における上記比は1.5:1未満であった。ピーク7+8の面積とピーク5+6の面積の高い比、およびピーク3+6+8とピーク2+5+7の面積の高い比の上記組合せは、本発明者の知る限り、従来技術のいかなる生成物にも示されなかった。TBOとして最も広く受け入れられている構造のピーク8はTBOの主要なピークであるので、それ故にピーク3、6および8がピーク2、5および7より好ましい。ピーク7および8は勿論ピーク5および6より好ましく、これはピーク2および3より好ましく、かかる順で好ましい。このように、本発明の最も好ましい実施の態様においては、上記生成物は上記2つの比の規準の組合せに該当する。

13

【0028】図3は、一般にマシュバークのプロトコルに従って臨床で採用されている規制要件に合致するTBO生成物の製造方法を示すプロセスフロー図である。図3における合成の出発物質10の高純度N,N-ジメチル-p-フェニレンジアミンは、市販されている。

【0029】

【化4】

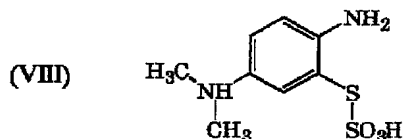


【0030】第一の反応混合物の形成

酸、硫酸アルミニウムおよび試薬13（中間体を錯体化するものと考えられ、TBO組成物の成分を錯体化するために工程の後のほうの段階で使用される）例えば塩化亜鉛の存在下に、好ましくは10℃以下で特に約5℃以下で、出発物質10の水溶液を好適な酸化剤12例えば重クロム酸カリウム12と反応させて酸化11する。次いで、チオ硫酸イオン14源例えばチオ硫酸ナトリウムを添加して、第一の中間体である2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸を含有する第一の反応混合物15を形成する。

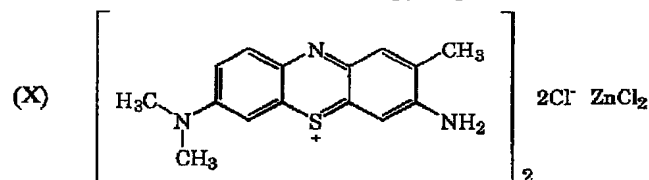
【0031】

【化5】



【0032】第二の反応混合物の形成

次に、縮合工程18において、好ましくは約10℃以下の温度で、第一の反応混合物15を更なる酸化剤16例えば重クロム酸カリウムおよびo-トリルイジン塩酸塩1*



【0037】濾過によりTBO-塩化亜鉛の複塩を混合物から分離して、TBO-塩化亜鉛/TBO塩酸塩のフィルターケーキ34を得る。

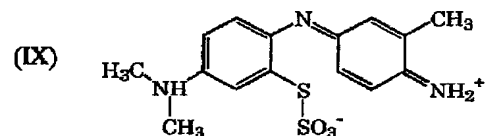
【0038】なお、前者の臨界体積の水29に関しては、水を多く用いすぎるとTBOの単離が妨げられる。水が少なすぎると、(1)全てのTBOが溶解しなくなり収率が低下する、(2)生成物の純度が低下する。一方、後者の臨界体積/濃度の塩化ナトリウム33に関しては、用いる塩化ナトリウムが少なすぎると、全ての生成物が塩析されず収率が低下するであろう。塩化ナトリウ

14

*7と更に反応させて、第二の中間体である縮合生成物のインダミンチオスルホン酸を第二の反応混合物19中に生成する。

【0033】

【化6】



10

【0034】第三の反応混合物の形成

その後、好ましくは約10℃以下の温度で好適な酸化剤22例えば重クロム酸カリウムを添加して、第二の反応混合物19を更に酸化21する。これに続いて、硫酸銅、錯体化試薬の塩化亜鉛、酸を添加して100℃に加熱し、インダミン環を閉環して、TBOを第三の反応混合物24中に生成する。この時点で、TBOを第三の反応混合物から分離し、精製する。

【0035】TBOの分離/精製

例えば、本発明のプロセスの現時点での好ましい実施の態様においては、TBOを好適な錯体化試薬25例えば塩化亜鉛で錯体化24し、TBOを第三の反応混合物から沈殿させて、錯体のTBO-塩化亜鉛複塩を生成する。沈殿物を液相から濾過26して、塩化ナトリウム溶液27で洗浄する。次いで、洗浄したフィルターケーキを臨界体積の水29に再溶解28させて、TBO溶液30を形成した後、これを濾過31して、溶解しなかった固形分32aを除去し廃棄する。その後、塩化亜鉛に続いて臨界体積/濃度の塩化ナトリウム33を濾過物32に添加し、下記の化学式に示すように（1つの異性体のみを示す）、再びTBO-塩化亜鉛の複塩を沈殿させる。

【0036】

【化7】

ムを多く用いすぎると、TBOと共に不純物が沈殿して生成物の収率が低下するであろう。

【0039】図3の破線で示すように、TBOのフィルターケーキ34の再溶解、濾過、再沈殿および再単離を数回繰り返すことにより、TBOを所望の純度および収率で得ることができる。その後、最終的に精製されたフィルターケーキの錯体生成物34を例えば慣用の対流式オープンおよび/または真空オープン中で乾燥35し、乾燥したフィルターケーキ36を粉碎およびブレンド37して、目的とするTBO生成物38が得られる。目的

50

とするTBO生成物には、TBOの塩化亜鉛複塩（化学式X）とTBOの塩化物塩（化学式IおよびII）の双方が含まれている。

【0040】第三の反応混合物の形成前に、すなわちインダミンチオスルホン酸の酸化および得られるTBO反応生成物の錯体化によるTBO-錯体の生成に先立って、錯体化試薬を導入すると、TBO異性体とそのN-脱メチル化生成物の比が改善されたTBO-錯体生成物が生じる。第三の反応混合物の形成前に錯体化試薬を導入すると、6:1以上の比を得ることができる。勿論、当業者ならば認識しているであろうが、異性体と脱メチル化誘導体の上記改善された比を得ることは、TBO-錯体生成物の収率および純度を改善することが望ましい本発明の好ましい実施の態様の開示に関連して以下に述べるように、他の処理パラメータの注意深い事前の対策にも幾分依存するであろう。しかし、たとえかかる収率および純度を高めるよう他の事前の注意深い対策を講じたとしても、第三の反応混合物の形成前にすなわちインダミンチオスルホン酸の酸化および得られるTBO生成物の錯体化前に、少なくとも錯体化試薬を添加しない限り、異性体とN-脱メチル化生成物の改善された望ましい比は得られないであろうし、2-位と4-位とにメチル基を有するピークの改善された望ましい比（2-位：4-位）は得られないであろう。

【0041】現時点では、錯体化試薬のより早い段階での添加すなわち第三の反応混合物の形成前の添加は、目的生成物の異性体：N-脱メチル化誘導体の比を改善するものと本発明者は考えている。というのは、出発物質および／またはチオスルホン酸および／またはインダミンチオスルホン酸の錯体の早い段階での生成は、脱メチル化反応に対して明らかに立体障害を呈するものと考えられる。換言すれば、増大した大きさと構造のため、錯体が立体的な嵩（そしてあるいは電子的な作用）を提供して、N-メチル基を酸化的な脱メチル化反応から保護するものと考えられる。3つの反応工程の全ては酸化反応と起こり得る脱メチル化反応を含んでいるため、最も早い段階で上記錯体が生成し得ることは有利であり、これは錯体化試薬をできるだけ早い段階で存在させることを本発明者が推奨する理由である。

【0042】本発明の更に最も好ましい実施の態様によれば、本発明者の先の米国特許出願に開示され前述の記載と関連するが、一般的なプロセスの収率は、前記したように、第一の反応混合物中にチオ硫酸イオン源を導入し、反応混合物を約10℃の低下させた温度に維持しながら、昇温した温度に高める前に上記低下させた温度で反応を継続して、第一の中間体を生成させることによって著しく高められる。このように、N,N-ジメチル-p-フェニレンジアミンおよび酸化剤を含有する反応混合物中で上記ジアミンを酸化し、チオ硫酸イオン源を導入し、引き続き約30分間かけて昇温した温度に高めて

反応混合物中に溶解したインダミンチオスルホン酸溶液を形成する工程からなる、中間体のインダミンチオスルホン酸の製造において、全プロセスから得られるTBO生成物の全収率は、温度を高めてインダミンチオスルホン酸反応混合物の溶液を形成する前に、酸化チオスルホン化反応混合物の温度を約10℃またはそれ以下で約30分間維持することによって非常に高められた。

【0043】

【実施例】作 業

10 以下の実施例は、当業者が新規なTBO組成物を製造し、使用し、該TBO組成物を使用する新規診断法を実施し、またTBO組成物の新規製造法を実施する（これらは共に本発明のさまざまな実施の態様である）ことができるような用語で本発明の実施を説明するために示すものであり、さらに本発明の様々な実施の態様を実施するための現時点で分かっている最良の方法を当業者に示すものである。これらの実施例は単に説明としてののみ示されるもので、前記特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲に対して実施例により制限を加えるものではない。

【0044】実施例1

製造方法

本実施例では、GMP条件に要求される規制を満たすのに必要な詳しさで、一連のTBO染料生成物を一般的な商業規模で製造する手法を正確に説明する。

原料溶液の調製

装置／補給品

A. オハウス(Ohaus) I P 15 K S 秤

B. アンド(AnD) H V 150 K A I 秤

30 C. フェアバンクス(Fairbanks) H 90-5 150 秤

D. オハウス(OHAUS) W B 25/1-20 W 秤

E. コールパーマー(Cole Parmer: 51201-30)およびサーモライン(Thermolyne: s25535) 攪拌機

F. 銅製へら、ドラム状試料取出装置等の試料取出装置

G. エルレンマイヤーフラスコ、ピーカー、カルボイおよび他の適当なガラス製品

H. 製造溶液用ラベル

【0045】安全性

MSDSガイドラインに従い化学品を取り扱う際には、グローブ、安全眼鏡、実験服およびガスマスク等の保護装置を身に纏うべきである。

原料溶液の調製法

塩酸1364.2g(±5.5g)にUSP精製水1364.2g(±5.5g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。硫酸アルミニウム・16水和物1779.1g(±7.0g)にUSP精製水2548.9g(±10.0g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。塩化亜鉛7384.6g(±30.0g)にUSP精製水2786.7g(±11.0g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。重クロム酸カリウム2101.9g(±8.0g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。

0 g)にUSP精製水25203.8 g(±100 g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。チオ硫酸ナトリウム・5水和物1526.6 g(±6.0 g)にUSP精製水2043.6 g(±8.0 g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。硫酸銅・5水和物509.7 g(±2.0 g)にUSP精製水1613.1 g(±6.0 g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。硫酸600.0 g(±2.0 g)にUSP精製水600.0 g(±2.0 g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。塩化ナトリウム70.4 kg(±250 g)にUSP精製水234.4 kg(±850 g)を添加する。溶液が透明になるまで攪拌する。

【0046】合成

合成装置および補給品

LFE制御パネル(3000)

蓋を備えた容量20ガロンのジャケット付きガラスライニング精製タンク(E71224)

蓋を備えた容量100ガロンのジャケット付きガラスライニング精製タンク2槽(P1,PT-001)(P2,L-13621)

FTS再循環式冷却器(RC96C032)および容量500ガロンの冷蔵タンク(500CST)

軸とインペラーを有するカフラモ(Caframo)混合機(BDC-1850)3機(R1,18500961)(P1,18501148)(P2,18501173)

軽量混合機(L1U08)(201550)

熱交換機(Gardner Machinery)3機(R1,01960763)(P1,01960764)(P2,08950727)

12KWのジャケット付き流動再循環機(Watlow,BLC726C3S20)3機

再循環ポンプ3機(Sta-Rite,JBHD-62S,C48J2EC15)

マスターフレックス(Masterflex)デジタルぜん動ポンプ(A94002806)

マスターフレックスぜん動ポンプ(L95003320)

コールバーマーぜん動ポンプ(B96002074)

【0047】ヌーチェ濾過装置(70-2038,43421-1)

ブーフナー濾過装置2機(Z11,624-6,Z10,441-8)

シーメンス真空ポンプ(F2BV2)

蓋を備えた容量60ガロンのガラスライニング回収タンク(86854,E164-1186)

空気圧縮機(DF412-2)(9502312538)

流量制御装置(3-5500)(69705069190)

パッチ式制御装置(3-5600)6機(#1,69705069191, #2,69705069199, #3,69705069194, #4,69705058829, #5,69705058805, #6,69705069195)

流動センサー6個(#1,69704295165, #2,69704024995, #3,69704024994, #4,69704025027, #5,69612178606, #6,69703120990)

ダイアフラムポンプ(M1)4台

サージサプレッサー(A301H)4機(#2,15557, #3,15561, #4,15558, #5,15559)

空気レギュレータ(CFR10)4機

電磁弁4個(空気レギュレータと一緒に使用)

低流量センサー(FS-500)4個

電磁弁(EASM5V16W20)3個

【0048】エアフィルター/レギュレータ(T1R)PTFE/F06R113AC

濾過媒体, ポリプロピレン(7211-1)

濾過媒体, ワットマン・グレード52

ファーマド(PharMed)チューブ(-18,-82,-90)

pHメータ; ハンナ(Hanna)9321(1303675)&オリオン620(001911)

分光光度計20(3MU7202070)

フィシュアー科学真空オープン(9502-033)

VWR1370FM強制式エアオープン(1370FM)

塵埃/ミスト・ガスマスク

トーマス・ワイリー実験室用ミル(3375-E10)

バターソン・ケリー(Patterson-Kelley)ブレンダー(Blendmaster,C416578)

オハウスTS4KD秤

オハウスIP15KS秤

メトラー社(Mettler AG)104秤

アンFHV150KAI秤

フェアバンクスH90-5150秤

オハウスAS123プリンター

オハウスAS142プリンター

AD-8121多機能プリンター

シティズンIDP3540ドット・マトリックス・プリンター

【0049】ヒューレット・パッカードHPLC(1050)

超音波洗浄機(8892-DTH, QCC9601 005C)

タイプK熱電対温度記録計(KTX,6292753,6355146)

エルレンマイヤーフラスコ(81,61,41,11)

ビーカー(81,61,500ml,250ml)

カルボイ(41,101,501)

HDPEドラム(55ガロン,100ガロン)

メスフラスコ(100ml)

プラスチック製漏斗

膨出部を有するバスツールピベットおよび膨出部を有するメスピベット(10ml,5ml)

ベロー(25ml,50ml)

40 秤量用紙

スパチュラ

包装材料(容器,蓋,ラベル)

原料溶液

【0050】合成:工程1

2-アミノ-5-ジメチルアミノフェニルチオスルホン酸の合成

・USP水システムの清浄性をチェックする。反応容器に秤量したUSPグレードの精製水(28,000g±100.0g)を添加して、190±10rpmで攪拌する。水を分配した時にUSP水の導電率を記録する。

・N,N-ジメチル-1,4-フェニレンジアミン(5.128モル,720.0g \pm 3.0g)を添加する。上記物質は粉末(塊ではない)として添加すべきである。10分間(\pm 5分間)攪拌する。

・塩酸(6N,1136.9g \pm 5.0g)を添加する。15分間(\pm 5分間)攪拌する。

・SOP#LM-007に従って目盛が付されているpHメータを確かめる。プラスチック製試料取出装置で約10mlの反応混合物試料を採取する。試料にロット# .IPS1aとマークを入れる。pHをチェックし記録する。pHは25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ Cで2.8 \sim 3.8でなければならない。

・硫酸アルミニウム・16水和物の溶液(4328.0g \pm 21.0g)を添加する。275 \pm 10rpmで10分間(\pm 5分間)攪拌する。

【0051】・塩化亜鉛溶液(3641.5g \pm 18.0g)を添加する。4 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ Cに冷却する。

・温度(PV1)が4 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ Cになると、20分(\pm 5分)かけて重クロム酸カリウム溶液(6532.4g \pm 32.0g)を添加する。添加が終了すると20分間(\pm 5分間)攪拌し、その後セットポイント(SP1)をメインメニューから25.0 $^{\circ}$ Cに変更する。

・温度が20.0 $^{\circ}$ C \pm 3.0 $^{\circ}$ Cに達すると、チオ硫酸ナトリウム・5水和物の溶液(3570.2g \pm 18.0g)を添加する。溶液を25 $^{\circ}$ Cで30分間(\pm 5分間)攪拌する。

・セットポイントを60 $^{\circ}$ Cに変更する。温度(PV1)が60.0 $^{\circ}$ C \pm 3.0 $^{\circ}$ Cに達すると、反応混合物を5分間(\pm 3分間)攪拌し、LFE制御装置のセットポイントを10.0に変更する。

・温度が13.0 $^{\circ}$ C \pm 2.0 $^{\circ}$ Cに達すると、プラスチック製試料取出装置で約10mlの反応混合物試料を採取する。試料にロット# .IPS1bとマークを入れる。pHをチェックし記録する。pHは25 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ Cで3.1 \sim 4.1でなければならない。

【0052】合成:工程2

インダミンチオスルホン酸の合成

・o-トリイジン(604.4g \pm 2.5g)を秤量し、氷浴中で18 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ Cに冷却する。塩酸(6N,1230.7g \pm 5.0g)をo-トリイジンに徐々に添加する。氷浴からo-トリイジン・塩酸塩を取り去り、溶液を38 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ Cに冷却する。溶液を反応混合物に添加し、5分間(\pm 3分間)攪拌する。

・重クロム酸カリウム溶液(6532.4g \pm 32.0g)を20分(\pm 5分)かけて添加する。添加が終了すると10分間(\pm 5分間)攪拌する。

・制御装置のセットポイント(SP1)を60.0に変更する。反応混合物の温度が60.0 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ Cに達すると、混合物を25分間(\pm 5分間)攪拌する。緑色のインダミンで構成された沈殿物が生じるであろう。

・ビベットで約10mlの反応混合物試料を採取する。

試料にロット# .IPS2とマークを入れる。溶液の色相を記録する。

【0053】合成:工程3

トリイジン・ブルーOおよびトリイジン・ブルーO-塩化亜鉛複塩の合成

・LFE制御装置のセットポイントを7.0に設定する。反応混合物の温度が10.0 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ Cに達すると、重クロム酸カリウム溶液(6532.4g \pm 32.0g)を20分(\pm 5分)かけて添加する。添加が終了すると20分間攪拌する。

・重クロム酸カリウム溶液(5225.4g \pm 26.0g)を20分(\pm 5分)かけて添加する。添加が終了すると20分間(\pm 5分間)攪拌する。

・ビベットで約10mlの反応混合物試料を採取する。試料にロット# .IPS3とマークを入れる。

・塩化亜鉛溶液(3641.5g \pm 18.0g)を添加する。350 \pm 10rpmで20分間(\pm 5分間)攪拌する。

・硫酸銅・5水和物(2122.8g \pm 10.0g)を添加する。15分間(\pm 5分間)攪拌する。

・ビベットで約10mlの反応混合物試料を採取する。試料にロット# .IPS4とマークを入れる。

【0054】・制御装置のセットポイント(SP1)を100.0に変更する。反応混合物の温度が67.0 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ Cに達すると、硫酸溶液の添加を開始し、添加量を半量(500ml, 250ml, 125ml等)に減少しながらpHを2.9 \pm 0.3とする。各々の添加とpHのチェックの後に、5 \sim 10分間攪拌する。

・反応混合物の温度が100.0 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ Cに達すると、混合物を35 \pm 5分間攪拌する。

・制御装置のセットポイント(SP1)を35.0に変更する。反応混合物の温度が70.0 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ Cに達すると、ビベットで約10mlの反応混合物試料を採取する。試料にロット# .IPS5とマークを入れる。

・制御装置のセットポイント(SP1)を2.5に変更する。4時間以内に2.5 $^{\circ}$ Cに冷却し、2.5 $^{\circ}$ C \pm 2.0 $^{\circ}$ Cで4 \sim 18時間保持する。

・ビベットで約10mlの反応混合物試料を採取する。試料にロット# .IPS6とマークを入れる。溶液の色相を記録する。pHをチェックし記録する。0.45 μ mの濾紙で試料を濾過する。沈殿物を約100mg採取して、HPLCで用いられる約100mlの水に溶解する。0.45 μ mの濾紙で溶液を濾過する。溶液にロット# .IPS7とラベルを付し、RP-HPLCによるトリイジン

・ブルーOの分析法により試料を分析する。実施例3参照。結果を記録する。

【0055】精製:工程1

・好適な濾過媒体(ワットマン・グレード52)で反応混合物を濾過する。

・反応容器を空にして、30%塩化ナトリウム溶液を2

4.0 kg ± 150.0 g および USP 水を 24.0 kg ± 150.0 g 秤量する（分配した水の導電率を記録する）。反応容器底部の弁を閉成し、15%塩化ナトリウム溶液を反応容器に添加する。溶液を短時間攪拌する。濾過が終了すると、塩化ナトリウム溶液を濾過装置に添加してフィルターケーキを洗浄する。濾過物を同じ容器に回収し、ロット#.HW1とラベルを付す（有害な廃棄物1）。

・廃棄物処分手続きに従って濾過物(ロット#.HW1)を処理する。

・容量100ガロンのガラスライニングされたジャケット付き精製タンク#1の調子をチェックし、タンクに日付とサインが記入され洗浄済(CLEANED)と適性にラベルが付されていたかどうかを確認する。HDPE製蓋、カプラモ攪拌機、攪拌軸、プロペラーおよびプラスチック製熱電対の窪みに挿入された熱電対プローブを備えたタンクを装着する。底部の弁が閉成され出口が蓋をされているかどうかをチェックする。

・タンクにロット#.P1A（精製工程1A）とラベルを付す。

【0056】・HDPE製容器中に入れたUSP水を190.0 kg ± 1.0 kg 秤量し（分配した水の導電率を記録する）、水を精製タンク1に移す。混合物を350 rpmで攪拌する。塩化ナトリウム溶液によるフィルターケーキの洗浄が終了すると、攪拌しながらフィルターケーキを精製タンク1に添加する。

・混合物を2～4時間攪拌する。約50 mlの試料を（底部の弁を通じて）採取する。試料にロット#.IPS8とマークを入れる。溶液の色相を記録する。

・精製タンク1のLFE制御装置を75.0 (SP1)に設定する。

・混合物の温度(PV1)が75.0℃ ± 3℃に達すると、制御装置のセットポイントを40.0に変更する。

・混合物を40℃において350 rpmで12～36時間攪拌する。

・約50 mlの試料を（底部の弁を通じて）採取する。試料にロット#.IPS9とマークを入れる。溶液の色相を記録する。pHをチェックし記録する。試料1.0 mlを容量1.0 mlのビレットで計り、容量100 mlのメスフラスコ中で100 mlに希釈する。この試料にロット#.IPS9Aとラベルを付す。次に溶液10.0 mlを容量10.0 mlのビレットで計り、容量100 mlのメスフラスコ中で100 mlに希釈する。この試料にロット#.IPS9Bとラベルを付す。分光計20+ (spectronic 20+) でこれらの試料の分光度を測定する。結果を記録する。試料9Bの吸光度は0.220以上であるべきである。

【0057】精製：工程2

・濾過装置における濾過媒体を通して混合物を濾過する。濾過物を風袋重量が測定された蓋付きのHDPE製

容器に回収する。

・容量100ガロンのガラスライニングされたジャケット付き精製タンク#2の調子をチェックし、タンクに日付とサインが記入され洗浄済と適性にラベルが付されていたかどうかを確認する。HDPE製蓋、カプラモ攪拌機、攪拌軸、プロペラーおよびプラスチック製熱電対の窪みに挿入された熱電対プローブを備えたタンクを装着する。底部の弁に洗浄済とラベルが付され、弁が閉成されている（水平位置）か、また出口が蓋をされているかどうかをチェックする。

・タンクにロット#.P2A（精製工程2A）と日付およびサインを記入したラベルを付す。

・濾過が終了すると容器および溶液を秤量する。風袋重量を除算する。溶液の重量を記録する。溶液の体積を計算する。

TBO溶液 ml = (TBO溶液の重量 g) (TBO溶液 100.0 ml / TBO溶液 100.42 g)

・フィルターケーキにロット#.HW2（有害な廃棄物2）とラベルを付し、廃棄物処分手続きに従って処理する。

【0058】・記録された上記溶液の体積と等量の30%塩化ナトリウム溶液量を清浄なHDPE製容器中に入れて、下記の式に基づいて秤量する。

NaCl 溶液 g = (TBO溶液 ml) (NaCl 溶液 116.91 g / NaCl 溶液 100.0 ml)

・試料 濾過物10 mlをとり、pHをチェックする。ロット#.IPS10とラベルを付す。pHは3.0～4.0でなければならない。濾過物（重量）を精製タンク2に移す。溶液を350 rpmで攪拌する。

・塩化亜鉛溶液 (1636.3 g ± 6.5 g) を添加する。

・塩化ナトリウム溶液（重量）を精製タンク2に移す。

・精製タンク2のLFE制御装置を75.0 (SP1)に設定する。

・混合物の温度(PV1)が75.0℃ ± 3℃に達すると、制御装置のセットポイントを5.0に変更する。

・6時間以内に5℃に冷却し、5℃ ± 4.0℃で4～24時間保持する。

・約50 mlの試料を（底部の弁を通じて）採取する。試料にロット#.IPS11.PT2.とマークを入れる。

【0059】処理

i. 濾過

・濾過装置における風袋重量が測定された濾過媒体(ワットマン・グレード52)を通して混合物を濾過する。

・30%塩化ナトリウム溶液を12 kg ± 50 g 秤量し、USP水12 kg ± 50 g で希釈する（分配した水の導電率を記録する）。ブーフナーに直接溶液を添加しながら15%塩化ナトリウム溶液でフィルターケーキを洗浄する。濾過が終了すると、トリイジン・ブルーO生成物を含有する濾紙を注意深く取り除く。

・廃棄物処分手続きに従ってロット#.HW3（有害な廃棄物3）を処理する。

【0060】ii. 乾燥

・TBO生成物をオープンに入れ、 $50.0^{\circ}\text{C} \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ で 5 ± 1 時間乾燥する。オープンにロット#.PRE-DRYとラベルを付す。

・強制式エアオープンから生成物を取り出し、真空オープンに入れる。 $45.0^{\circ}\text{C} \pm 3.0^{\circ}\text{C}$ において $28''\text{Hg} \pm 2''\text{Hg}$ で 10 ± 2 時間乾燥する。オープンにロット#.DRYとラベルを付す。

【0061】iii. 秤量

・生成物を取り出してトルイジン・ブルーOと濾過媒体の重量をはかる。濾過媒体の重量を除算してTBO重量を記録する。

・ステンレス鋼製へらで濾紙から生成物を注意深く取り出す。塵埃／ミスト・ガスマスクを身につける。トルイジン・ブルーOを秤量する。

【0062】iv. 粉碎

・生成物を「トルイジン・ブルーOを仕上げ域」に移す。トーマス・ワイリー実験室用ミルの調子をチェックし、ミルに日付とサインが記入され洗浄済と適性にラベルが付されていたかどうかを確認する。 0.5mm のスクリーンを使用する。清浄な容器に送出シュートを付設する。チャンバーの扉を閉めて掛け金を掛けておかねばならない。

・ホッパー底部のスライド・シャッターを閉め、ホッパーの蓋を取り除いて試料を添加する。ホッパーの蓋を元に戻す。ミルをオンに切り替え、スライド・シャッターを僅かに開口する。ミルのスピードが落ちたり動かなくなったりしないよう、試料をミルのチャンバーに十分に時間をかけて供給する。

・粉碎が終了すると、送出シュートから石工瓶を取り出す。

【0063】v. ブレンド

・バターソーネクリー実験室用ブレンダーの調子をチェックし、ブレンダーに日付とサインが記入され洗浄済と適性にラベルが付されていたかどうかを確認する。

・トルイジン・ブルーO生成物をブレンダー容器に移し、蓋を閉める。タイマーを15分間 \pm 5分間にセットする。

【0064】vi. 試験

試験のために生成物をサンプリングする。RP-HPLCによるトルイジン・ブルーOの分析法により試料を分析する。結果を記録する。

【0065】実施例2

臨床試験のプロトコル

臨床試験溶液の調製

本実施例では、口の形成異常の確認において実施例1のTBO生成物の使用を説明する。実施例1のTBO生成物、キイチゴ風味料（IFF Raspberry IC563457）、酢酸

ナトリウム・3水和物の緩衝剤および過酸化水素（30%USP）保存剤（米国特許第5,372,801号明細書参照）を、精製水（USP）、氷酢酸およびSD18のエチルアルコールに溶解して、表1に示す組成を有するTBO試験溶液を調製する。

【0066】

【表1】

表1

成分	重量%
TBO生成物	1.00
風味料	0.20
緩衝剤	2.45
保存剤	0.41
酢酸	4.61
エチルアルコール	7.48
水	83.85
	100.00

【0067】精製水中の濃度が1重量%の酢酸、安息香酸ナトリウム保存剤およびキイチゴ風味料を含有する先行洗浄液および後行洗浄液の試験溶液を調製する。

【0068】臨床プロトコル

患者は前掛けを掛けて衣服を保護する。感染用ゴミ容器に捨てるか、あるいは洗面台を汚さないよう洗面台の排水管の中心に直接注ぐことが可能な内容物を捨てることのできる10オンス・カップが患者に用意されているので、痰唾が吐き出されるものと思われる。汚されるかも知れない周囲表面または対象物は、前掛け等で覆われているか試験領域から取り除かれている。柔らかい組織を傷付けたり切り取ったりする可能性のある器具を全く使用することなく、視覚による口の癌検査が行われる。柔軟な組織や歯の外観が予め汚れている場合は覚書が作成される。

【0069】患者は、口腔を約15mlの先行洗浄溶液で約20秒間洗浄し、過剰の唾液を除いて常に一定の口環境をもたらすよう上記溶液を吐き出す。引き続き、更に先行洗浄溶液を用いて上記段階を繰り返す。次に、患者は、水で20秒間洗浄しうがいをして吐き出す。次に、患者は、30mlのTBO試験溶液で1分間洗浄しうがいをして吐き出す。次に、患者は、15mlの後行洗浄溶液で20秒間洗浄して吐き出す。この段階はその後繰り返される。次に、患者は、水で20秒間洗浄しうがいをして吐き出す。引き続き、この段階を繰り返す。

【0070】その後、必要に応じて、縮小、程良い明るさおよび拡大を含む柔軟な組織の適当な検査技法により、口腔の観察を行う。青い色合いを留めた状態にある疑わしい病巣の位置、大きさ、形態、色相および表面特性を観察し、記録する。偽の陽性を減らすために、前記プロトコルに記載の手順を10～14日間繰り返した後、患者は元の状態に戻される。この期間は、潰瘍性ま

たは外傷性のあらゆる病巣を治癒するか、あるいは最初の検査時の病因を検討する時間に当てる。最初の検査で見つけられた疑わしい領域を再び検査した後の陽性の着色は、癌または前癌症状の組織を示すものとみなされ、この結論を確認するために生体組織片の検査が行われる。

【0071】早い時期に赤色に形成した病巣は、しばしば点彩または斑模様に青く着色する。しかし、舌背上の不規則な味蕾の裂け目付近に持続する着色は正常であり、陽性を示すものではない。青い着色が持続するが陽性とはみなされない他の領域には、歯苔、各歯の歯肉の縁、舌背上に持続する着色から移転した色素が原因でおこる軟口蓋の拡散した着色、そして容易に消散する潰瘍性の病巣が含まれる。本試験では陽性に着色していないにもかかわらず、病巣が非常に疑わしい場合は全て、生体組織片の検査を受けることが肝要である。

【0072】実施例3

HPLCの手法

本実施例では、確認、評価および純度試験に用いられるTBO試料の分析手法を記載する。

装置および補給品

HPLCグレードのアセトニトリル

試薬級の氷酢酸

試薬級の酢酸アンモニウム

HPLC分析に好適な脱イオン水

pHメータとpH4.0、pH7.0の各標準緩衝液

メスフラスコおよびビベットを含む実験室用ガラス製品

超音波浴

分析秤

マグネチック攪拌機

圧縮ヘリウム

0.45 μmのナイロン製フィルターを有する濾過装置
100 μlのシリンジ

【0073】HPLCクロマトグラフおよび付属品

ヒューレット・パッカード社のシリーズ1050ポンプ
または同等の能力を有する高圧定流量ポンプ

ヒューレット・パッカード社のシリーズ1050ダイオードアレー検知器または同等の波長域の紫外線検知器

ウルトラVGA1280モニターおよびレーザープリンターを備えたヒューレット・パッカード社のベクトラ(Vectra)シリーズ3ディスクドライブ(コンピュータ制御装置)または同等の積分レコーダー

プロディジー(Prodigy), 5 μm, QDS(3)100 Å, 2.5 cm×4.6 mmまたは同等のHPLCカラム
固定式ループ注入器(10または20 μl)

カラム加熱器

【0074】移動相の調製

酢酸アンモニウム0.77 gを容量1000 mlのメスフラスコに移して、0.01 M酢酸アンモニウム溶液1 lを調製する。水を添加し、混合、溶解させ、水で希釈

して所定の濃度とする。0.010 M酢酸アンモニウム溶液をエルレンマイヤーフラスコに移し、マグネチック攪拌機で攪拌する。pH4.0および7.0の緩衝液に合わせて予め目盛を調整したpHメータを用いて、酢酸で溶液のpHを3.3~3.6の間に調整する。溶液を0.45 μmのフィルターに通して濾過する。ミリポア(Millipore)濾過装置によりアセトニトリルを0.45 μmのナイロン製フィルターに通して濾過し、正確に250 mlを攪拌された酢酸アンモニウム水溶液に添加する。この移動相の貯蔵容器をHPLCポンプによりアクセスできる位置に置き、ヘリウムで5~10分間バージする。

【0075】TBO試料の調製

TBO試料を約50 mg正確に秤量して、容量100 mlのメスフラスコに移し、水で所定の濃度に希釈する。フラスコに栓をし、30分間超音波処理して、混合する。これは約0.5 mg/mlの保存溶液である。保存溶液10.0 mlを容量100 mlのメスフラスコに移し、水で所定の濃度に希釈して混合する。この希釈された約0.05 mg/mlのTBO作業溶液に適当にラベルを付す。

【0076】クロマトグラフの条件

注入容積-10または20 μl

流速-約1.5 ml/分

カラム温度-40℃

検出器の波長-254 nm

感度と減衰の設定: 使用機器に適合

積分-面積に応答

【0077】試料のHPLC分析

起動させて、HPLCを移動相の流れと平衡させる。U SP XXIIIと同じシステム適合試験を採用して、得られるHPLCデータの精度と正確さを実証する。各分析対象については、下記のパラメータを評価する。精度: 作業試料の注入を最低5回比較する。相対標準偏差(RSD)は2.0%またはそれ未満でなければならない。ピーク5~8の合わせた面積に関するRSDが2.0%より大きく3.0%未満の場合は、注入を6回行う。

【0078】解像度: 1つのクロマトグラフに対する試料のピーク7および8(主要なピーク)のベースライン解像度(R)を下記の式により算出する。

$$R = 2(t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$$

ここで、

t_1 = ピーク7のmmにおける保持時間

t_2 = ピーク8のmmにおける保持時間

w_1 = ピーク7のmmにおけるピーク幅

w_2 = ピーク8のmmにおけるピーク幅

ピーク7と8の間の解像度は1.5より大きくなければならない。

【0079】テーリング: ピークの下部の定量的な面積を保証するには、ピークの対称性を測定することが正確である。1つのクロマトグラフに対する試料のピーク7

および8のテーリング因子(T)を下記の式により算出する。

$$T = W_{0.05} + 2f$$

ここで、

$W_{0.05}$ = ベースラインピークからピークの高さの5%に定められたピークの幅

f = ピークの頂点と $W_{0.05}$ におけるピークの始点の距離

Tは因子が3より小さくあるべきである。クロマトグラムを記録し、クロマトグラムに現れる主要なピーク（ピーク5、6、7および8）ならびに検出される全ての不純物のピーク（最初に現れる溶媒のピーク以外の全てのピーク）に回答する面積を求める。

【0080】計算および他のHPLCの決定事項

同定(TBO薬剤物質および薬剤生成物)

調製試料のクロマトグラフ図は、図2に描かれたクロマトグラムと同じ一般的な図(ピークの存在およびピークの強度)を示すはずである。

関連する物質(薬剤物質)

クロマトグラムにおける全てのピークの全面積に対する面積%として各不純物のピーク(ピーク1、2、3および4で示される既知の不純物と他のあらゆる不純物のピークとの和)の量を算出する。

【0081】TBO薬剤物質の評価

不純物に関しては、主要な4つのTBOピーク(ピーク5~8)の各百分率を下記の式から求めることにより算出される。すなわち

*

* HPLC純度 = $100 \times (\text{ピーク面積5~8の合計}) / (\text{全てのピーク面積の合計})$

【0082】以上、当業者が理解でき実施できるような用語で本発明を記載し、また目下のところ本発明の好ましいとされる最良の方法を識別して本発明を説明したものである。

【0083】

【発明の効果】本発明の染色用組成物は、トルイジン・ブルーO異性体とその異性体の脱メチル化誘導体との比などが所定の値以上であることにより、形成異常の組織を確認するための使用においても再現性が向上した。また本発明の染色用組成物の製造方法により、収率が低くかつ再現性に乏しい従来のトルイジン・ブルーO染料合成法において、錯体化試薬を早期に導入することで、上記染料を高収率、高純度で信頼かつ反復して調整することが可能となった。

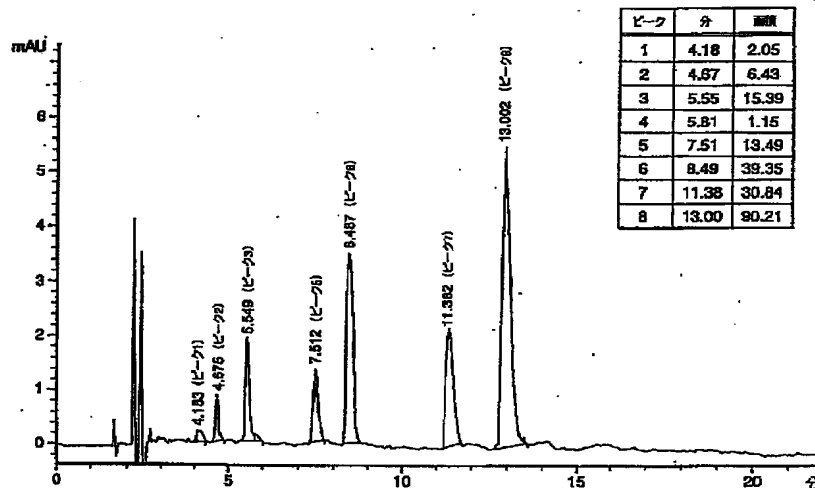
【図面の簡単な説明】

【図1】 従来公知で市販されていたTBO生成物含有の組成物の代表的な特性であるピークを表す254nmのHPLCのチャート図である。

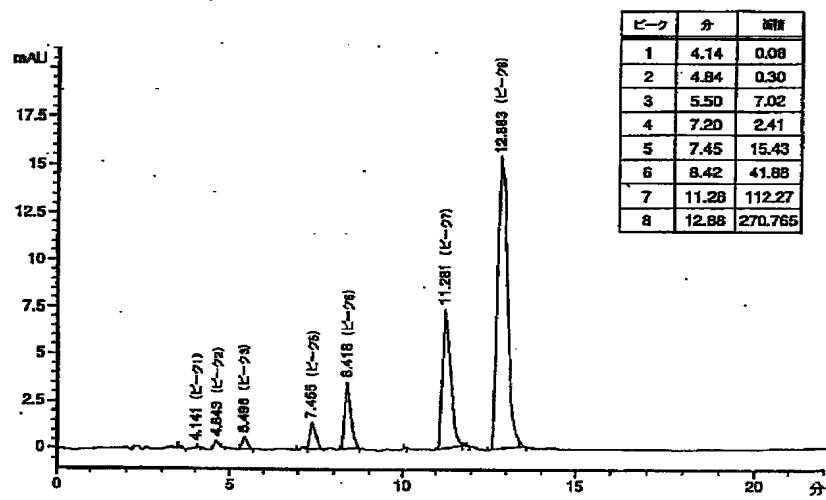
【図2】 本発明の代表的なTBO生成物を含有する組成物の特性であるピークを表す254nmのHPLCのチャート図である。

【図3】 本発明の新規なTBO生成物を含有する、本発明者が発見したTBO生成物の製造方法を表すプロセスフロー図である。

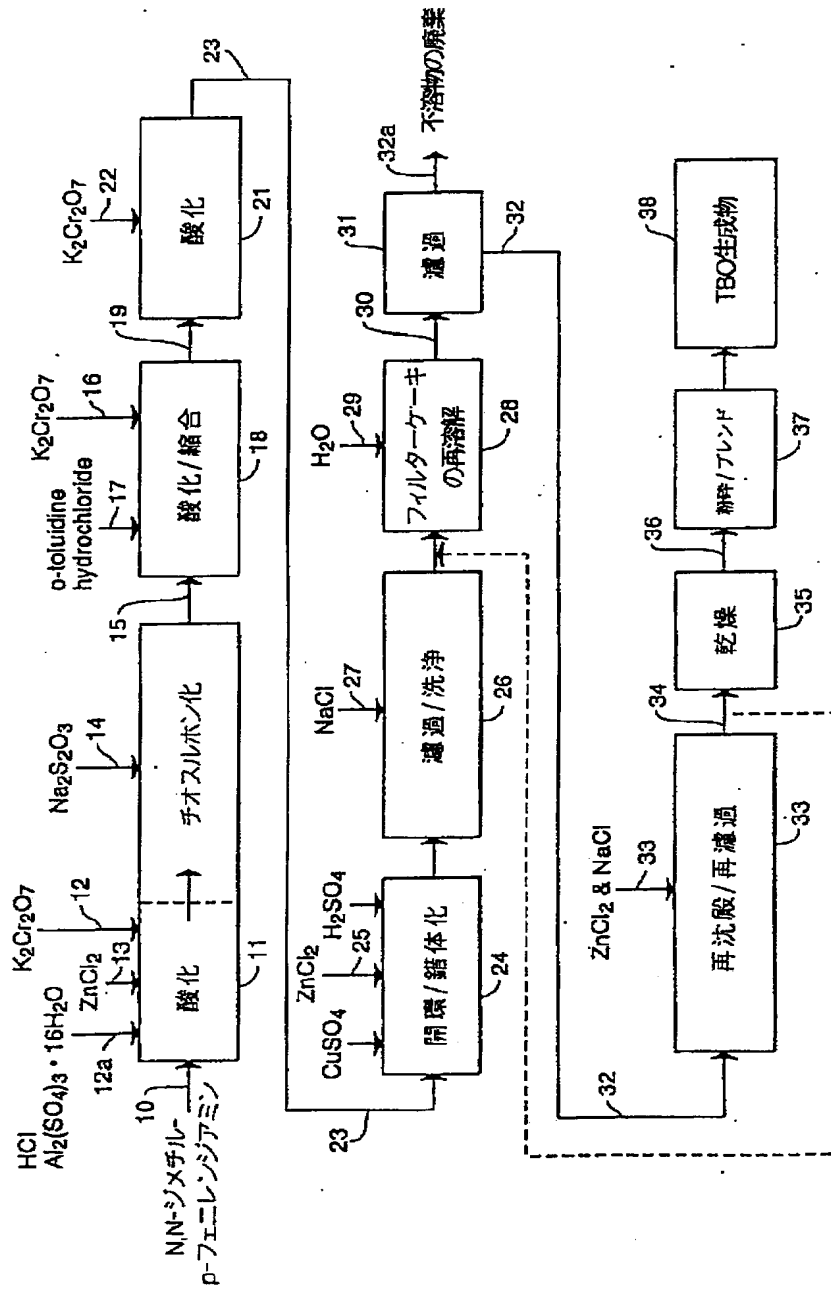
【図1】



【図2】



【図3】





PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 49/00, G01N 31/00, 33/48	A1	(11) International Publication Number: WO 99/25388 (43) International Publication Date: 27 May 1999 (27.05.99)
--	----	--

(21) International Application Number: PCT/US97/20981

(22) International Filing Date: 13 November 1997 (13.11.97)

(71) Applicant (for all designated States except US): ZILA, INC.
[US/US]; 5227 North 7th Street, Phoenix, AZ 85014-2800 (US).

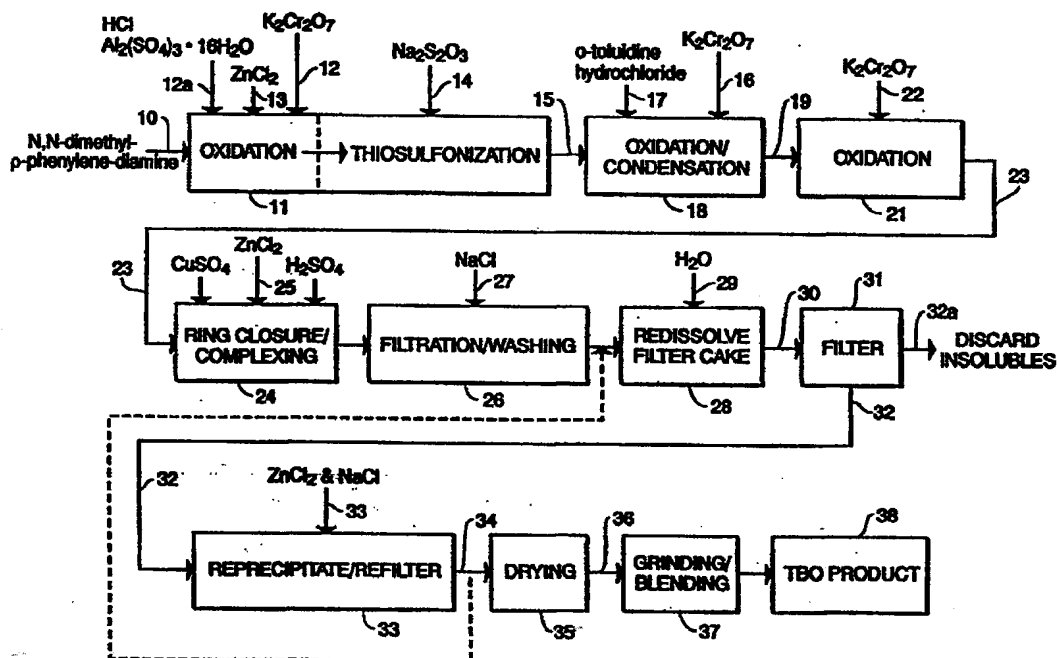
(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): BURKETT, Douglas, D.
[US/US]; 4113 East Liberty Lane, Phoenix, AZ 85004 (US).(74) Agent: DRUMMOND, William, H.; Drummond & Duckworth,
Suite 500, 4590 MacArthur Boulevard, Newport Beach, CA 92660 (US).

(81) Designated States: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SK, TR, US, Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Published

With international search report.

(54) Title: *IN VIVO* STAIN COMPOSITION, PROCESS OF MANUFACTURE, AND METHODS OF USE TO IDENTIFY DYSPLASTIC TISSUE

(57) Abstract

Novel biological stain compositions that are adapted for human *in vivo* topical application. In particular, novel Toluidine Blue O, TBO, dye products, products which contain TBO and specific TBO derivatives are disclosed.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						